

201208009A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬と  
その有効成分の同定

(H22-創薬総合-一般-009)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 垣 塚 彰

平成25(2013)年5月

## 目 次

I. 総括研究報告書 -----	1
アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその 有効成分の同定 垣塚 彰	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	1 1
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	1 5

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）  
総括研究報告書

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその有効成分の同定  
研究代表者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

## 研究要旨

本研究では、我々が独自に作製した家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスに対し、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスの投与を行い、そのアルツハイマー病の予防効果の解析を行った。その結果、啤酒花エキスの長期にわたる経口投与は、アルツハイマー病モデルマウスの記憶・学習能力の低下と情緒異常を有意に抑制し、また、大脳皮質や血管壁への $\beta$ アミロイドの沈着も有意に抑制した。したがって、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスは、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬として極めて有望であると考えられた。

### A. 研究目的

超高齢化社会に突入しつつある我が国では、アルツハイマー病に代表される認知症を患う患者の急激な増加が予想される。しかしながら、現在、有効な治療法が無いため、患者のみならず患者の家族を救う手段が無い。今十分な対応策を講じなければ、来るべき医療費と人的負担の膨大な増加は、我が国の存亡をも左右しかねない事態になる。一方、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題である。特に世界でもっとも顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学政策は無いとさえいえる。

アルツハイマー病の病因の最も上流に位置すると考えられているのが

老人斑の主要構成成分である $A\beta$ の産生である。 $A\beta$ は、その前駆体蛋白質であるAPP（amyloid precursor protein）の膜貫通近傍部分から $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼの2つの蛋白質プロセシング酵素の働きで切り出される。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で $A\beta$ （特に $A\beta_{42}$ ）の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には、 $\gamma$ セクレターゼによる $A\beta$ のAPPからの切り出しが律速段階であると想定されている。

従来、 $\gamma$ セクレターゼ活性は、 $A\beta$ のC-末を認識する抗体を用いたELISA法によって産生された $A\beta$ 量を定量し、その量から推測する方法しかなかった。しかし、ELISA法は非常にコストが高いため、 $\gamma$ セクレターゼ阻害物質のスクリーニングを行うには莫大な費用が必要であった。我々は、

このコスト高という問題を解決するために、安価に $\gamma$ セクレターゼ活性を評価するアッセイ系を構築した。このアッセイ系では、APPのC-末部位に非哺乳類の転写因子を融合した蛋白質を培養細胞に発現させた。 $\gamma$ セクレターゼによってこの融合蛋白質が切断を受けるとC-末部位の転写因子が核内移行する。そこで、この転写因子に応答して、ルシフェラーゼを発現するレポーターを用いることで、この転写因子の転写活性をモニターし、 $\gamma$ セクレターゼ活性の強さを評価するというアッセイ系である。このアッセイ系によって、 $\gamma$ セクレターゼ活性の評価を高価なELISA法を用いることなく、安価なルシフェラーゼ活性の測定で行えるようになった。

アルツハイマー病に対する薬物治療・予防においては、かなりの長期間に渡って薬物投与を行う必要が想定される。したがって、いかに副作用の少ない治療薬を提供できるかが極めて重要となる。このような少ない副作用という点で、我々は漢方薬に代表される植物エキスに注目した。漢方薬は数百年から千年を超えてヒトに使われており、大幅に摂取量を間違わない限り安全であることが実証されている。

我々は、漢方薬の原料になっている植物エキス約1,600種類に対し、上記のアッセイ系を用い、細胞が持つ $\gamma$ セクレターゼ活性に対する阻害活性の評価を行った。その結果、啤酒花（ヒシユカ）と雷公籐（ライコウトウ）エキスに明らかな $\gamma$ セクレターゼの阻害

活性を認めた。

一方、アルツハイマー病に対する予防・治療効果の判定には、試験管内での $\gamma$ セクレターゼの阻害効果の測定のみでは不十分である。同定した植物エキスが実際にin vivoでのアルツハイマー病予防効果を持つかどうかを判定するために、独自にアルツハイマー病モデルマウスを作製した。

本研究では、同定した $A\beta$ の産生を阻害する活性をもつ植物エキスの内啤酒花エキスをアルツハイマー病モデルマウスに長期間経口投与し、アルツハイマー病の予防効果を詳細に解析することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. アルツハイマー病モデルマウスに対する啤酒花エキスによる治療効果の解析

$\gamma$ セクレターゼの抑制活性を示す漢方薬エキスが実際にin vivoでアルツハイマー病の抑制効果があるかどうかを確認するためには、動物での検証が不可欠である。これまでに、幾つかのアルツハイマー病モデルマウスの報告があり、その内のいくつかは市販されていたり、また、MTAを交わすことで入手が可能である。しかしながら、これらのマウスは非常に高価であったり、交配によって増やすことが禁じられていたり、さらには、薬物開発に利用することの制限があり、いずれのマウスも非常に使い勝手が悪い。

我々はこれまでに幾つかのトランスジェニックマウスを作製した実績があるので、脳の神経細胞に特異的に

発現させることを目的に、神経特異的エノラーゼ（NSE：neuron-specific enolase）遺伝子のプロモーターを用い、家族性アルツハイマー病の原因となる Indiana 変異（V717F）をもつ変異 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。このトランスジェニックマウス同士を掛けあわせ、トランスジーンをホモに持つ雌雄を得、それらをさらに掛けあわせることで、トランスジーンがホモの状態ですべての細胞で発現させた（以下、APP マウス）。一方、変異 APP 遺伝子に加え、同じく家族性アルツハイマー病の原因となる変異をもつ変異プレセニリン遺伝子を同時に発現させるトランスジェニックマウスを作製した（以下、APP/PS マウス）。このトランスジェニックマウスについても2つの変異遺伝子をホモに持つ状態で維持することを試みたが、そのようなダブルホモのトランスジェニックマウスは得ることができず、APP/PS マウスの個体数を増やすことに予定以上に時間を要した。現在、この APP/PS マウスに対しても植物エキスの投与を開始している。

得られた APP マウスを2群に分け、その内の1群には、啤酒花エキス 2 g を1リットルの水に加えたものを離乳後より自由摂取させ、もう1群には、エキスを加えない水を自由摂取させた。また、対象として週齢の一致する野生型マウスを用いた。これらの3群のマウスに対し、体重と飲水量の測定を行った。また、定期的に Open field 試験、Morris 水迷路試験等の行動・学

習試験を行った。さらに、生後 16 ヶ月時点で脳組織での $\beta$ アミロイドの沈着を解析した。

## 2. 高い $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ啤酒花の選別と抽出方法の検討

国内外で育成されている約 20 種類の啤酒花に対し、水で抽出したエキスとエタノールで抽出したエキスを作製し、 $\gamma$ セクレターゼの阻害活性に違いがあるかどうかの検討を行った。

### （倫理面への配慮）

動物実験：京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題に関わる実験は含まれていない。

トランスジェニックマウスの作製は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて行った。

## C. 研究結果

### 1. アルツハイマー病モデルマウスに対する啤酒花エキスによる治療効果の解析

野生型マウス、水飲水 APP マウス、啤酒花飲水 APP マウスについて、月齢 18 ヶ月までに渡って解析を行った。この間、3群の間で体重及び飲水量に有意な差は観察されなかった。また、啤酒花の飲水によってトランスジ

ンの mRNA レベルにも変化は認められなかった。Open field テストにおいて、これら 3 群のマウスの活動量に有意な差は認められなかったが、18 ヶ月齢において、水飲水 APP マウスにのみ、側壁から離れて中央部分に滞在する時間の有意な上昇が認められた（不安感情の欠如）。記憶・学習能力を測定する Morris 水迷路試験では、生後 6 ヶ月齢において、水面下のプラットフォームにたどり着くまでの時間に野生型マウスと水飲水 APP マウスの間に差が見え始め、9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢では水飲水 APP マウスで、有意に遅延した。これらの月齢において啤酒花飲水 APP マウスでは、プラットフォームにたどり着くまでの時間は、野生型マウスとほぼ同等であった。一方、水面下のプラットフォームの位置を記憶しているかどうかを検証するプローブテストにおいても、9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢において、野生型マウスと水飲水 APP マウスの間で、有意な差を認めたが、啤酒花飲水 APP マウスと野生型とに差は認められなかった。しかしながら、15 ヶ月齢及び 18 ヶ月齢においては、啤酒花エキスの飲水による記憶・学習能力の保持は、もはや観察されなかった。

生後 16 ヶ月に 3 群のマウスの脳を組織学的に解析した。結果、水飲水 APP マウスの大脳皮質頭頂部において顕著な  $\beta$  アミロイドの沈着を認めた。この  $\beta$  アミロイド沈着は啤酒花飲水 APP マウスでは有意に低下していた。また、水飲水 APP マウスにおいてのみ大脳血管壁への  $\beta$  アミロイド沈着が

認められた。

## 2. 高い $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を持つ啤酒花の選別と抽出方法の検討

これまでの実験では、中国産の啤酒花を用いたが、本実験では国内外で育成されている約 20 種類の啤酒花から水及びエタノールで抽出したエキスを調整し、それぞれに含まれる  $\gamma$  セクレターゼの阻害活性の比較を行った。その結果、同じ啤酒花でも品種によって含まれる  $\gamma$  セクレターゼの阻害活性に大きな差があることが判明した。また、この  $\gamma$  セクレターゼの阻害活性は、水での抽出エキスには、ほとんど検出できないことが明らかとなった。

## D. 考察

今後著しい患者数の増大が予測されるアルツハイマー病に対して、有効な薬剤を用意することは極めて重要な課題である。家族性アルツハイマー病の研究から、これまでに同定されたほぼ全ての原因遺伝子の変異によって  $A\beta$ （特に  $A\beta_{42}$ ）の産生亢進が引き起こされていることが示され、孤発性のアルツハイマー病においても  $A\beta$  の産生抑制が有効な治療戦略になるであろうと推測されている。

$A\beta$  は、その前駆体蛋白質である APP の膜貫通近傍部分から  $\beta$  セクレターゼと  $\gamma$  セクレターゼの 2 つのプロセシング酵素の働きで切り出されるが、 $A\beta$ （特に  $A\beta_{42}$ ）の産生抑制には C-末部位の切り出しを担う  $\gamma$  セクレターゼの活性抑制が極めて重要であると推測されている。

長期に渡る治療が想定されるアルツハイマー病の治療薬には、副作用が少なく安全であることが極めて重要である。我々は、安全性が確立している漢方薬に注目し、これまでに、漢方薬の原料となっている約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、啤酒花と雷公籐エキスに  $\gamma$  セクレターゼを阻害する成分が含まれることを見いだした。

我々が作製した神経細胞特異的に Indiana 変異 (V717F) をもつ APP を発現させたトランスジェニックマウス (APP マウス) は、加齢と共に記憶・学習能力の低下を認め、18 ヶ月齢では不安行動の減少を認めた。組織学的には、16 ヶ月齢において、大脳皮質頭頂部および脳血管周辺にアミロイドの沈着が観察された。この APP マウスに、離乳後より啤酒花エキスを飲水に混ぜ自由摂取させたとこころ、9 ヶ月齢と 12 ヶ月齢で顕著な記憶・学習能力の保持が観察された。しかしながら、この効果は、15 ヶ月齢以降では観察されなかった。即ち、啤酒花エキスの投与によって、認知機能の低下を遅延させる効果は明確に確認できたが、完全に防ぐまでにはいたらなかった。一方、18 ヶ月齢の水飲水 APP マウスに認められた不安行動の抑制という表現型は、啤酒花飲水 APP マウスでは全く観察されず、啤酒花エキスの投与は、アルツハイマー病患者に観察される情緒異常に対しても予防効果が期待できることを示唆している。

国内外で育成されている約 20 種類の啤酒花エキスに含まれる  $\gamma$  セクレタ

ーゼの阻害活性を解析したところ、ほとんど活性の無いものから中国産の物と比較して数倍強い阻害活性を示すものまで、まちまちであった。これらの結果から、 $\gamma$  セクレターゼの阻害活性を含む啤酒花エキスを正しく選別することで、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬を提供できると考えられた。

## E. 結論

我々が開発した、 $\gamma$  セクレターゼの活性を簡便に評価するアッセイ系を用いて同定した  $\gamma$  セクレターゼの阻害活性を持つ漢方薬植物エキスの内、啤酒花エキスの長期にわたる経口投与は、アルツハイマー病モデルマウスの記憶学習能力の低下と情緒異常を有意に抑制し、また、大脳皮質や血管壁への  $\beta$  アミロイドの沈着も有意に抑制した。したがって、 $\gamma$  セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスは、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬として極めて有望であると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Muraoka Y, Ohashi-Ikeda H, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto- Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, & Yoshimura N. Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain



Optical Coherence Tomography. **PLoS ONE** 7: e36135, 2012.

Takata T, Kimura Y, Ohnuma Y, Kawawaki J, Kakiyama S, Tanaka K, & Kakizuka A. Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMFPD-VCPs. **J. Str. Biol.** 173: 93-103, 2012.

Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, Kakizuka A, & Sehara-Fujisawa A. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. **PLoS One** 7:e47078, 2012.

Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, & Kakizuka A. VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels. **PLoS One.** 8:e56012, 2013.

Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Tsukano C, Takemoto Y, & Kakizuka A. Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. (submitted)

## 2. 学会発表

(招待講演)

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学(京都)平成

24年6月22日

垣塚 彰「緑内障および網膜色素変性症マウスモデルに対して有効性を示した新規 VCP 阻害剤の開発」京都大学新技術説明会 JST 東京別館ホール (東京)平成24年8月24日

垣塚 彰「新規神経保護薬の開発とその緑内障動物モデルに対する応用」第23回日本緑内障学会 石川県立音楽堂(金沢)平成24年9月28日

垣塚 彰「細胞内主要 ATPase VCP の役割とその新規制御薬の開発」糖尿病研究センターセミナー/転写代謝セミナー 国立国際医療研究センター(東京)平成24年10月19日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部(金沢)平成24年10月30日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学(東京)平成24年11月6日

垣塚 彰「細胞内主要 ATPase VCP の生理・病態における役割とその新規制御薬の開発」奈良県立医大大学院セミナー 奈良県立医大(奈良)平成24年11月30日

垣塚 彰「新規の作用機序による緑内障および網膜色素変性症治療薬」イノベーションフェア関西 グランキューブ大阪(大阪)平成24年12月6日

(一般発表:口頭)

池田華子、中野紀子、村岡勇貴、板谷正紀、垣塚彰、吉村長久「VCP 阻害剤による網膜色素変性モデルマウスにおける神経保護効果の検討」第116回日本眼科学会総会 東京国際フォーラム (東京) 平成24年4月5日

中野紀子、池田華子、村岡勇貴、板谷正紀、垣塚彰、吉村長久「VCP 阻害剤によるマウス網膜神経節細胞傷害モデルにおける神経保護効果の検討」第116回日本眼科学会総会 東京国際フォーラム (東京) 平成24年4月6日

池田華子、中野紀子、村岡勇貴、吉村長久、垣塚彰「緑内障モデルマウスにおける VCP 阻害剤による神経保護効果の検討」第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会 京都大学百周年時計台記念館 (京都) 平成24年6月8日

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama, Tadashi Uemura, & Akira Kakizuka. "Fluorescent ATP biosensor optimized for imaging of cells from non-vertebrate model organisms" International Symposia "New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences" The University of Tokyo (Japan) September 28, 2012.

Hanako Ikeda, Noriko Nakano, Yuki Muraoka, Masanori Hangai, Akira Kakizuka, & Nagahisa Yoshimura. "Neuroprotective effects of VCP

inhibitors on DBA/2J mice, a mouse model of glaucoma" 第23回日本緑内障学会 石川県立音楽堂 (金沢) 平成24年9月28日

Shu-ichiro Sakamoto, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura. Imaging of intracellular ATP dynamics in single apoptotic cells. The 11<sup>th</sup> International Student Seminar, Shiran Kaikan (Kyoto) March 6, 2013.

(一般発表:ポスター)

笹岡紀男、坂本めぐみ、兼森祥子、大泉宏、垣塚彰「アルツハイマー病予防薬の探索と薬理学的効果」第7回日本ケミカルバイオロジー学会年会 京都大学百周年時計台記念館 (京都) 平成24年6月8日

池田華子、中野紀子、垣塚彰、吉村長久「NMDA 硝子体内投与緑内障モデルマウスにおける VCP 阻害剤による網膜神経節細胞保護効果の検討」18回成人病の病因・病態の解明に関する研究発表会 平成24年7月7日

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama, Jun-ichi Kishikawa, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, Ken Yokoyama, & Tadashi Uemura. "Genetically-encoded ATP biosensor for low temperatures" European Bioenergetic Conference 2012, University of Freiburg (Germany) September 19, 2012.

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama, Tadashi Uemura, & Akira Kakizuka. "Fluorescent ATP biosensor optimized

for imaging of cells from non-vertebrate model organisms” International Symposia "New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences" The University of Tokyo (Japan) September 27, 2012.

田中喬、長嶋一昭、稲垣暢也、野地博行、垣塚彰、今村博臣「蛍光 ATP バイオセンサーを用いたインスリン分泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測」日本生体エネルギー研究会 岡山大学（岡山）平成 24 年 12 月 22-24 日

坂本修一郎、野地博行、垣塚彰、今村博臣アポトーシスにおける細胞内 ATP の挙動の解析日本生体エネルギー研究会 岡山大学（岡山）平成 24 年 12 月 22-24 日

Shu-ichiro Sakamoto, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura. Imaging of intracellular ATP dynamics in single apoptotic cells. The 11<sup>th</sup> International Student Seminar, Shiran Kaikan (Kyoto) March 5-6, 2013.

Yuko Ito, Masaaki Koike, & Akira Kakizuka. “Regulation of autophagosome formation by Golgi dynamics via CDC2-p37/p47/VCP axis” The 11<sup>th</sup> International Student Seminar, Shiran Kaikan (Kyoto) March 5-6, 2013.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

発明の名称：「加齢黄斑変性予防・治療薬」、発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、村岡勇貴、吉村長久。出願人：国立大学法人京都大学。出願日：出願日：平成 23 年 2 月 20 日、特願 2013-221873.

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muraoka Y, Ohashi-Ikeda H, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, <u>Kakizuka A</u> , Yoshimura N.	Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography.	PLoS ONE	7	e36135	2012
Takata T, Kimura Y, Ohnuma Y, Kawawaki J, Kakiyama S, Tanaka K, <u>Kakizuka A</u> .	Rescue of growth defects of yeast <i>cdc48</i> mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs.	J. Str. Biol.	173	93-103	2012
Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, <u>Kakizuka A</u> , Sehara-Fujisawa A.	In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells.	PLoS ONE	7	e47078	2012
Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, <u>Kakizuka A</u> .	VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Levels.	PLoS ONE	8	e56012	2013
Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Tsukano C, Takemoto Y, <u>Kakizuka A</u> .	Tsukano C, Takemoto Y, & Kakizuka A. Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice.	submitted			2013

### III. 研究成果の刊行物・別刷

# Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography

Yuki Muraoka<sup>1</sup>, Hanako Ohashi Ikeda<sup>1\*</sup>, Noriko Nakano<sup>1</sup>, Masanori Hangai<sup>1</sup>, Yoshinobu Toda<sup>2</sup>, Keiko Okamoto-Furuta<sup>2</sup>, Haruyasu Kohda<sup>2</sup>, Mineo Kondo<sup>3</sup>, Hiroko Terasaki<sup>4</sup>, Akira Kakizuka<sup>5</sup>, Nagahisa Yoshimura<sup>1</sup>

**1** Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **2** Center for Anatomical Studies, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **3** Department of Ophthalmology, Mie University School of Medicine, Tsu, Japan, **4** Department of Ophthalmology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, **5** Laboratory of Functional Biology, Kyoto University Graduate School of Biostudies and Solution Oriented Research for Science and Technology, Kyoto, Japan

## Abstract

**Background:** Recently, a transgenic rabbit with rhodopsin Pro 347 Leu mutation was generated as a model of retinitis pigmentosa (RP), which is characterized by a gradual loss of vision due to photoreceptor degeneration. The purpose of the current study is to noninvasively visualize and assess time-dependent changes in the retinal structures of a rabbit model of retinal degeneration by using speckle noise-reduced spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT).

**Methodology/Principal Findings:** Wild type (WT) and RP rabbits (aged 4–20 weeks) were investigated using SD-OCT. The total retinal thickness in RP rabbits decreased with age. The thickness of the outer nuclear layer (ONL) and between the external limiting membrane and Bruch's membrane (ELM–BM) were reduced in RP rabbits around the visual streak, compared to WT rabbits even at 4 weeks of age, and the differences increased with age. However, inner nuclear layer (INL) thickness in RP rabbits did not differ from that of WT during the observation period. The ganglion cell complex (GCC) thickness in RP rabbits increased near the optic nerve head but not around the visual streak in the later stages of the observation period. Hyper-reflective change was widely observed in the inner segments (IS) and outer segments (OS) of the photoreceptors in the OCT images of RP rabbits. Ultrastructural findings in RP retinas included the appearance of small rhodopsin-containing vesicles scattered in the extracellular space around the photoreceptors.

**Conclusions/Significance:** In the current study, SD-OCT provided the pattern of photoreceptor degeneration in RP rabbits and the longitudinal changes in each retinal layer through the evaluation of identical areas over time. The time-dependent changes in the retinal structure of RP rabbits showed regional and time-stage variations. *In vivo* imaging of RP rabbit retinas by using SD-OCT is a powerful method for characterizing disease dynamics and for assessing the therapeutic effects of experimental interventions.

**Citation:** Muraoka Y, Ikeda HO, Nakano N, Hangai M, Toda Y, et al. (2012) Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. PLoS ONE 7(4): e36135. doi:10.1371/journal.pone.0036135

**Editor:** Steven Barnes, Dalhousie University, Canada

**Received:** November 27, 2011; **Accepted:** March 26, 2012; **Published:** April 27, 2012

**Copyright:** © 2012 Muraoka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This research was supported by Research grants from the Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders and the Japan Foundation for Applied Enzymology, and a Grant-in-Aid for Young Scientists (22791656) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: hanakoi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

## Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is an inherited retinal disorder characterized by a progressive loss of visual function due to degeneration of rod and cone photoreceptors and eventual atrophy of the entire retina [1,2]. However, there are no effective treatments for RP. Various animal models of RP have been developed and studied to elucidate the pathophysiology of the disease and to develop new treatments [3–10]. Of these models, only monkeys have a macula, an important area for vision due to the high density of cone photoreceptors. However, it is not easy to study the pathophysiology of RP in monkeys due to handling and

breeding difficulties. Rabbits are known to have a visual streak, where the rod and cone photoreceptor density is highest, about 3 mm ventral to the optic nerve head (ONH) [11,12]. Rabbits are easy to breed and handle, and the physiology and morphology of rabbit retina is well understood [11–14]. Additionally, in mid-sized animals like rabbits, surgical treatments such as subretinal injection of cells for regenerative therapy [15,16], vectors for gene therapy [17], and implantation of intraocular devices [18,19] are easily performed. Therefore, rabbits are very useful for studying retinal diseases and testing new therapeutic interventions. For these reasons, we used transgenic (Tg) rabbits with mutated rhodopsin (Pro 347 Leu, RP rabbits) as a mid-sized model for RP

[20] to study the pathophysiology and develop new evaluation systems for retinal degeneration.

Optical coherence tomography (OCT) devices allow non-invasive detection of retinal architecture, including quantitative measurements of retinal thickness and longitudinal observation of the retinal architecture [21]. The technological advances in spectral-domain OCT (SD-OCT) have enabled high-speed scanning and improved image resolution [22]. Furthermore, the exact averaging of B-scans with a three-dimensional eye-tracking system and high-speed scanning have enabled sufficient reduction in speckle noise, the most influential artificial noise that blurs the boundaries between retinal layers [23,24]. These advances have improved visualization of individual retinal layers, including both the outer retina and the inner retina (i.e., ganglion cell layer and inner plexiform layer [IPL] in humans) [25,26]. SD-OCT imaging also enables evaluation of the junction between the inner segment (IS) and the outer segment (OS) of the photoreceptors (IS/OS) [27–29] and that of the external limiting membrane (ELM) [30,31] as hallmarks of photoreceptor integrity. That is, visual function can be speculated from OCT images to some extent. Thus, the use of OCT imaging in humans has contributed to a more detailed understanding of the pathophysiology of many retinal diseases. In mice, the retina has been clearly visualized using SD-OCT [32–37]. Thus, in experimental animals, SD-OCT may allow *in vivo* detection and monitoring of changes in retinal architecture without sacrificing animals.

In mouse models of retinal degeneration, Fischer [36] and Huber et al. [32] detected and analyzed photoreceptor degeneration by using SD-OCT. They imaged the thinning of inner

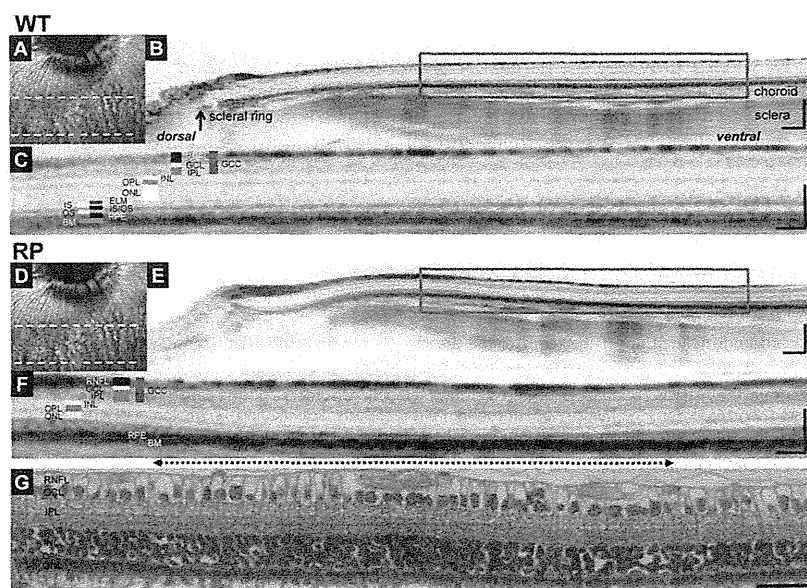
retinal layers and compared the total retinal thickness with that of normal mice in several mouse RP models. Yamauchi et al. reported the retinal architecture of rabbits by using SD-OCT following iodoacetic acid-induced photoreceptor degeneration [38]. However, retinal pathomorphology of genetically engineered rabbit models of RP, which mimic human RP [20], and longitudinal assessment of changes in the individual retinas remain to be studied with SD-OCT.

The purpose of this study was to visualize the time-dependent changes in photoreceptors, elucidate the pattern of changes in each retinal layer around the visual streak in identical eyes of RP rabbits by using SD-OCT, and assess the visual functions by electroretinography (ERG).

## Results

### Visualization of retinal structures in RP rabbits with SD-OCT

We first investigated whether the retinal structures of WT rabbits could be clearly visualized using SD-OCT. Vertical OCT images, which passed through the center of the ONH (Fig. 1A), permitted clear identification of each retinal layer, the choroid, and sclera of WT rabbits (Figs. 1B and 1C). The ELM and IS/OS lines were also clearly identifiable, the integrity of which have been shown to be positively associated with visual function. In the vertical OCT images, the scleral ring was defined as the edge of the ONH so that OCT measurements could be longitudinally compared between each rabbit and between WT and RP rabbits (Fig. 1B).



**Figure 1. SD-OCT images of WT and Retinitis Pigmentosa (RP) rabbit retinas and histology of the visual streak in an RP rabbit.** (A) A fundus infrared image of a WT rabbit retina, including optic nerve head (ONH) and visual streak. The area between dotted lines is the visual streak. (B) A vertical SD-OCT image along the green arrow in panel A, which passes through the center of the ONH. On this vertical image, the scleral ring was regarded as the lower margin of the ONH. (C) A magnified OCT image of the area enclosed by the blue square in panel B, which includes the visual streak. (D) A fundus infrared image of a RP rabbit retina, including the ONH and visual streak. (E) A vertical SD-OCT image of a 20-week-old RP rabbit along the green arrow in panel D. (F) A magnified OCT image of the area enclosed by the blue square in panel E. The 2.2 mm width of this OCT section was vertically cut between 1.8 mm and 4.0 mm ventral to the inferior edge of the ONH. A dotted arrow indicates the region of the visual streak. (G) Hematoxylin-Eosin staining of a retinal section corresponding to the area in the OCT image in F. Scale Bar = 200  $\mu$ m (B, E), 100  $\mu$ m (C, F), and 50  $\mu$ m (G). RNFL, retinal nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; GCC, ganglion cell complex; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; ELM, external limiting membrane; IS, inner segments of photoreceptors; OS, outer segments of photoreceptors; IS/OS, junctions between IS and OS; RPE, retinal pigment epithelium; and BM, Bruch's membrane.  
doi:10.1371/journal.pone.0036135.g001



Next, we examined a 20-week-old RP rabbit that expressed mutated rhodopsin (Figs. 1D–1F). The outer nuclear layer (ONL) of the RP rabbit was much thinner than the WT rabbit. Furthermore, in the RP rabbit, the photoreceptors around the visual streak (indicated by the dotted arrow), where the densities of rod and cone photoreceptors were the highest, appeared to be more severely damaged than in any other area. In this area, the ONL was very thin and the outer plexiform layer (OPL) was faint or absent depending on the distance from the ONH and the IS/OS line was undetectable (Fig. 1F). This regional variation in photoreceptor damage was also detected with hematoxylin and eosin (H&E) staining in the same eye (Fig. 1G).

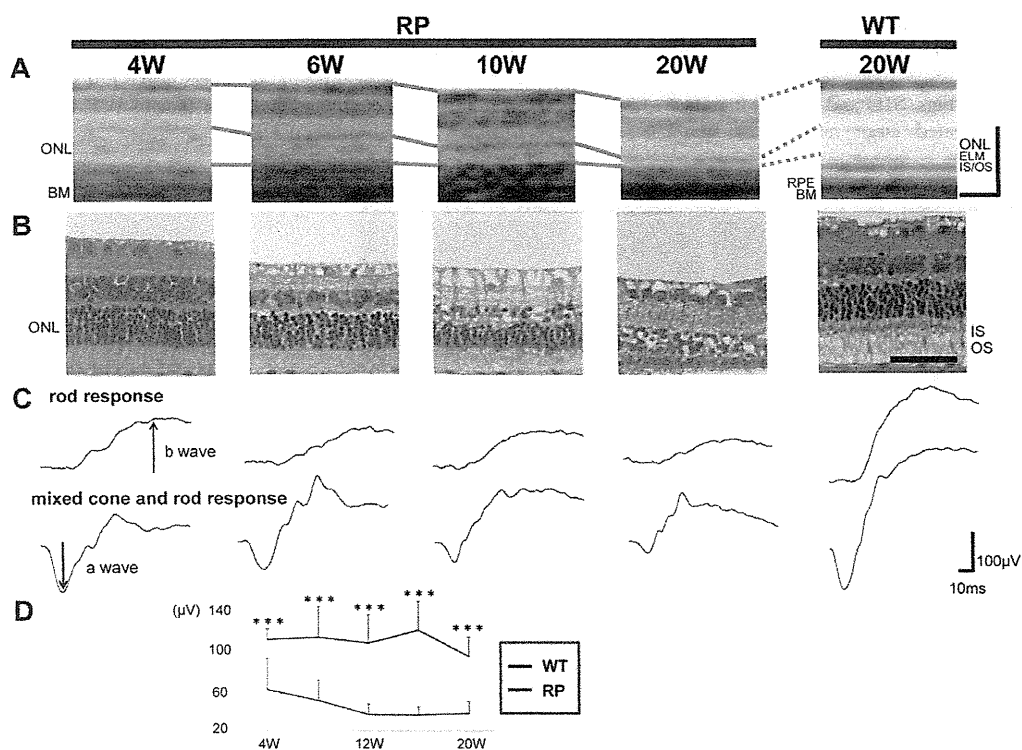
### Time-dependent changes in the photoreceptor layers and in the visual function of RP rabbits

As observations revealed that photoreceptor damage was severe around the visual streak, we were encouraged to investigate the time-dependent changes in the photoreceptors of identical RP rabbits beneath the visual streak with SD-OCT and compared them with those of the WT rabbits (Fig. 2A). At 4 weeks of age (with the youngest that can be examined by OCT), the ONL of RP rabbits was almost as thick as WT rabbits. Following 4 weeks of age, the ONL thickness in RP rabbits decreased. At 20 weeks, the ONL thickness in RP rabbits was much smaller than in WT

rabbits. Photoreceptor IS and OS, where visual phototransduction occurs, were thin in RP rabbits. In contrast, the architecture of the inner retina was relatively preserved in RP rabbits at both 10 and 20 weeks of age.

In the current SD-OCT study, there were additional findings in the photoreceptor layers. In the sections of WT rabbits, the reflectivity of IS and OS was low compared to that of the ELM and IS/OS lines. In contrast, the IS and OS were highly reflective in RP rabbits, and almost equivalent to the ELM and IS/OS lines throughout the study ages (Fig. 2A).

To compare the SD-OCT data with those from the histological examination, histological sections of the age-matched RP and WT rabbits were prepared (Fig. 2B). The number of photoreceptors and thickness of the ONL, IS, and OS in the RP rabbits decreased with age, which is consistent with those of a previous report [20]. At 20 weeks of age, the nuclei of photoreceptors in RP rabbits were reduced to 1 or 2 rows, which was much less compared to WT rabbits. The magnitude of the decrease in ONL thickness appears similar between the histological and SD-OCT data (Figs. 2A and 2B). In the histological sections of a 4-week-old RP rabbit, the total retinal thickness and the ONL thickness were almost the same as those of the WT rabbit, and the IS and OS appeared intact. The high reflectivity in the IS and OS observed in the OCT sections was difficult to explain by the histological sections (Figs. 2A and 2B).



**Figure 2. Time-dependent changes in morphological features of the retina and visual function in the RP rabbits.** (A) SD-OCT images beneath the visual streak in an RP rabbit at 4, 6, 10, and 20 weeks and in a 20-week-old WT rabbit. The total retinal and ONL thickness in the RP rabbits decreased with age. The IS and OS were highly reflective in the RP rabbits compared with the WT rabbits. ONL, outer nuclear layer; and OS, outer segments of photoreceptors. (B) Hematoxylin-eosin staining of retinas in 4-, 6-, 10-, and 20-week-old RP and 20-week-old WT rabbits. The ONL in RP rabbits thinned with age. In 20-week-old RP rabbits, only 1–2 layers of nuclei were detected in the ONL. (C) Representative scotopic electroretinograms of 4-, 6-, 10-, and 20-week-old RP and 20-week-old WT rabbits. (D) The a-wave amplitude of the mixed rod and cone response. The amplitude was smaller in the RP rabbits than in the WT rabbits. The differences between the WT and RP rabbits were significant at all study points between 4 and 20 weeks.  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  (unpaired *t*-test). Scale Bar = 100  $\mu$ m in A, and 50  $\mu$ m in B. ONL, outer nuclear layer; ELM, external limiting membrane; IS/OS, junctions between inner segment (IS) and outer segment (OS); RPE, retinal pigment epithelium; and BM, Bruch's membrane.

doi:10.1371/journal.pone.0036135.g002

Next, to evaluate visual function of the rod and cone systems of RP rabbits, scotopic full-field ERG was recorded (Fig. 2C). The a-wave of the mixed cone and rod response, which mainly originates from the photoreceptors, was smaller in RP rabbits ( $61.2 \pm 30.5 \mu\text{V}$ ) (mean  $\pm$  SD) than in WT rabbits ( $110.3 \pm 10.7 \mu\text{V}$ ;  $P=0.010$ , unpaired *t*-test) as early as 4 weeks. The a-wave amplitude was reduced with RP rabbit aged (Fig. 2D). At the age of 20 weeks, the a-wave amplitude decreased to  $37.6 \pm 11.5 \mu\text{V}$  in RP rabbits and was significantly less than that of WT rabbits ( $93.5 \pm 19.0 \mu\text{V}$ ;  $P<0.001$ , unpaired *t*-test, Figs. 2C and 2D). The b-wave amplitude of the rod response, which originates indirectly from bipolar and Müller cells, was  $97.3 \pm 33.2 \mu\text{V}$  in RP rabbits and was less than that of WT rabbits ( $280.8 \pm 71.3 \mu\text{V}$ ;  $P<0.001$ , unpaired *t*-test, Fig. 2C). These data suggest that the visual function of both the rod and cone systems was disturbed in RP rabbits, consistent with a previous report [20]. These results indicate that loss of photoreceptors and concomitant visual dysfunction gradually occurs in RP rabbits.

### Vesicles cleaved from photoreceptors and disorganization of IS and OS in RP rabbits account for the hyper-reflectivity seen in SD-OCT images

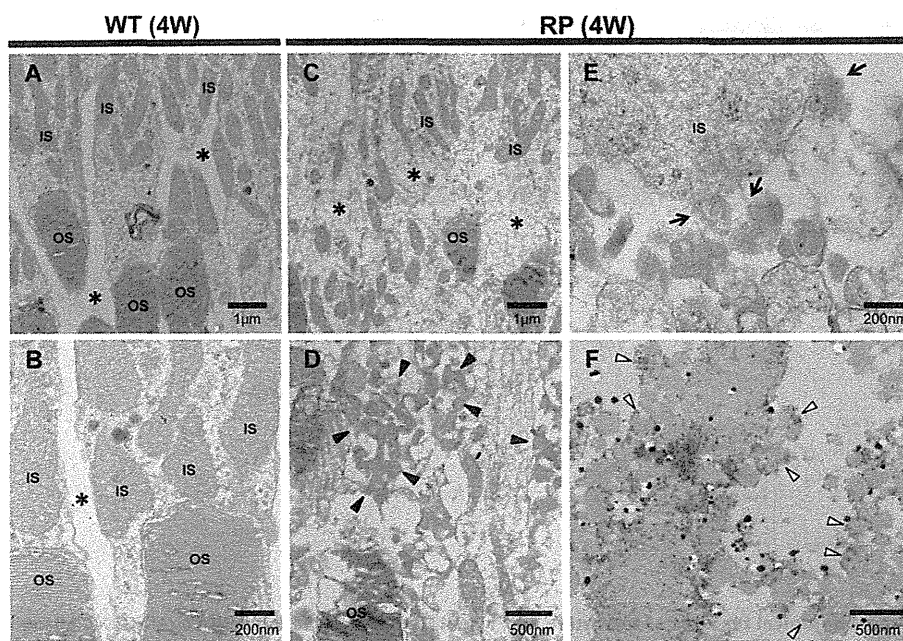
To elucidate the cause of the hyper-reflective change in the outer photoreceptor layers of RP rabbits in SD-OCT sections, we examined and compared the ultrastructure of the retina between RP and WT rabbits at 4 or 20 weeks of age. In WT rabbits, the IS and OS exhibited a dense and regular arrangement (Figs. 3A, 3B, S1A and S1B). In contrast, in the RP retinas, the IS and OS were less organized at 4 weeks of age (Figs. 3C and 3D), and they were mostly absent at 20 weeks of age (Figs. S1C and S1D). Magnified images of the RP retinas revealed large number of small,

approximately 100 nm, vesicles scattered in the extracellular space around the photoreceptors (arrowheads in Fig. 3D and S1D). These small vesicles appeared to be cleaved from the membrane of the IS in RP rabbits (arrows in Fig. 3E and S1D). The disrupted organization and the presence of vesicles between the IS and OS on ultra microscopy may account for the hyper-reflectivity seen in the corresponding area of the SD-OCT images.

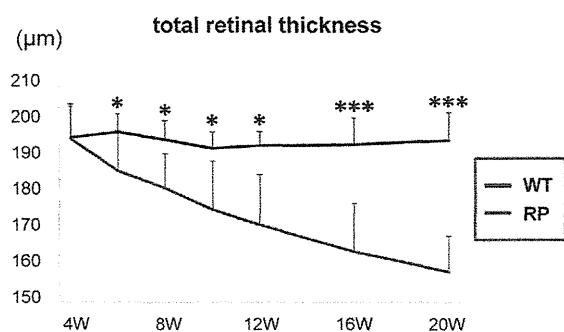
To determine the origin of the vesicles, we performed ultrastructural immunohistochemistry by using monoclonal antibodies against rhodopsin (Fig. 3F). In RP retinas, numerous vesicles with dots were observed, indicating the presence of rhodopsin within the vesicles (disintermediated arrowheads in Fig. 3F).

### Time-dependent changes in the individual retinal layers in SD-OCT sections exhibit regional and time-stage variations in RP rabbits

In the SD-OCT examinations, the retinal thickness in the RP rabbits appeared to decrease with age. Therefore, we quantitatively measured the mean total retinal thickness around the visual streak in the WT and RP rabbits (Figs. 4A and S2). As shown in Fig. 4A, the total retinal thickness in WT rabbits did not change with age, whereas that of the RP rabbits progressively decreased. The total retinal thickness in WT and RP rabbits was not significantly different at 4 weeks. However, after 6 weeks, the differences in the total retinal thickness increased and continued with age. At 20 weeks, the total retinal thickness in RP rabbits was  $165.8 \pm 8.5 \mu\text{m}$  and significantly smaller than that of WT rabbits ( $194.3 \pm 7.7 \mu\text{m}$ ;  $P<0.001$ , unpaired *t*-test).



**Figure 3. Ultrastructure of photoreceptors in WT and RP rabbits.** (A, B) Ultrastructure of photoreceptors in 4-week-old WT rabbits. The inner (IS) and outer segments (OS) of the photoreceptors were regular and dense. There are no vesicles in the extracellular spaces (\*). (C–E) Ultrastructure of the photoreceptors in the 4-week-old RP rabbits. The IS and OS were less organized than those in the WT rabbits. In the magnified image (D), the RP rabbit retina showing many small vesicles (arrowheads) accumulated in the extracellular spaces (indicated with \* in panel C). The vesicles appeared to be cleaved from the IS into the extracellular space around the photoreceptors (arrows in panel E). (F) Ultrastructural immunohistochemistry by using an anti-rhodopsin antibody. The small vesicles (disintermediated arrowheads) in the extracellular spaces around the photoreceptors exhibit black dots indicating the presence of rhodopsin.  
doi:10.1371/journal.pone.0036135.g003



**Figure 4. Time-dependent changes in total retinal thickness, and mixed cone and rod response in the WT and RP rabbits.** The total retinal thickness was measured within a circle 1 mm in diameter 3 mm ventral to the lower margin of the ONH and averaged. The total retinal thickness in the WT rabbits (indicated with a blue line) was unchanged during observation, whereas that in the RP rabbits (indicated with a red line) severely decreased with age. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (unpaired *t*-test). doi:10.1371/journal.pone.0036135.g004

OCT examination showed that the photoreceptors were most severely damaged at the visual streak, approximately 3 mm ventral to the ONH [11]. Therefore, we longitudinally examined regional and periodical variations in the progression of retinal degeneration in RP rabbits. For this purpose, we measured the thickness of each retinal layer within 0.5-mm areas 4 mm ventral to the lower edge of the ONH as a function of distance from the lower optic disc margin at 4, 6, 10, and 20 weeks by using the vertical OCT images that passed through the center of the ONH and visual streaks (Fig. S3).

**ONL thickness.** We first evaluated the thickness of the ONL where the nuclei of photoreceptors are located (Fig. 5A). In WT rabbits, the ONL in each area became slightly thinner with age. In younger WT rabbits (4–6 weeks old), the ONL was thinner in areas more distant from the ONH. In RP rabbits, the decrease in ONL thickness with age was more progressive than that of WT rabbits. At any age examined, thinning of the ONL was greater in areas more distant from the ONH. At 10 and 20 weeks, the ONL was thinnest in the area 3.0–3.5 mm ventral to the ONH.

At 4 weeks, the ONL thickness in RP rabbits was significantly less than that of WT rabbits in only the area 3.0–3.5 mm from the ONH ( $P = 0.037$ , unpaired *t*-test). Areas that exhibited a difference in ONL thickness between WT and RP rabbits expanded with age. At 20 weeks, the ONL thickness in RP rabbits was significantly smaller than that of WT rabbits in each of the 7 areas examined ( $P < 0.001$ , unpaired *t*-test, Fig. 5E).

**ELM–BM thickness.** The ELM–BM thickness was evaluated because the area between the ELM and BM includes the length of the IS and OS where visual phototransduction occurs (Figs. 5B and S3). In WT rabbits, the ELM–BM thickness was larger in areas more distant from the ONH at any age examined. On the other hand, in RP rabbits, the differences in the ELM–BM thickness between areas as a function of distance from the ONH were smaller compared to those of WT rabbits at 4–10 weeks; the ELM–BM thickness appeared to decrease mainly in the areas distant from the optic disc. In 20-week-old RP rabbits, the ELM–BM thickness markedly decreased in the area 2.5–3.5 mm ventral to the ONH and was significantly less than that in the corresponding areas in WT rabbits ( $P < 0.001$ , unpaired *t*-test, Fig. 5E).

**INL thickness.** The INL comprises the nuclei of bipolar, horizontal, amacrine, and Müller cells. The INL thickness was larger in areas more distant from the ONH in both WT and RP

rabbits at the ages of 4 to 20 weeks (Fig. 5C). The INL thickness in WT and RP rabbits was not significantly different in each corresponding area at all the ages examined (Fig. 5E).

**GCC thickness.** The GCC consists of the retinal nerve fiber layer (axons of ganglion cells), ganglion cell layer (somata of ganglion cells), and IPL. To determine the influence of photoreceptor degeneration on the inner retina, GCC thickness was measured (Figs. S3 and 5D). The GCC thickness in the WT and RP rabbits exhibited a similar pattern in all the areas examined at the ages of 4 and 6 weeks. However, in 20-week-old RP rabbits, the GCC thickness in the areas close to the ONH was larger than in younger RP rabbits and in the corresponding areas of 20-week-old WT rabbits ( $P < 0.001$  for both, unpaired *t*-test, Fig. 5E).

In summary, the decrease in the ONL and ELM–BM thickness in RP rabbits was first detected in the areas approximately 3.0 mm ventral to the lower edge of the ONH (areas corresponding to the visual streak). Thinning of the IS and OS (measured as the ELM–BM thickness) followed thinning of the ONL. In contrast, the INL thickness in RP rabbits did not change throughout the observational period of 4 to 20 weeks. The GCC thickness in RP rabbits increased in areas away from the visual streaks but close to the ONH in the later phase of observation (Fig. 5E).

## Discussion

In this study, we examined time-dependent changes in photoreceptor degeneration in identical RP rabbits, and compared the pattern of changes in individual retinal layers between WT and RP rabbits for the first time by using SD-OCT. In RP rabbits, we observed regional differences in the degree of photoreceptor loss. That is, the ONL (ONL: the somata of photoreceptors) in RP rabbits was thinnest beneath the visual streak, where the densities of rod and cone photoreceptors were the highest in WT rabbits, and the photoreceptors of RP rabbits were relatively preserved in the area near the ONH. The current observations by using SD-OCT revealed longitudinal changes in the RP rabbit retina that were fairly consistent with a previous histological study of the RP rabbits [20] and reports based on other animal models of RP [3,9].

To elucidate the unique “highly reflective IS and OS” feature of the outer photoreceptor layer during photoreceptor degeneration in RP rabbits, an electron microscopy study was conducted on 4- or 20-week-old RP rabbits. We detected vesicles around the photoreceptors and loss of most of the IS and OS. We speculate that these destructive structures in RP rabbits cause the hyper-reflectivity seen in the outer photoreceptor layers (between ELM and BM) on SD-OCT images (Fig. 2A). The vesicles appeared to be cleaved from the IS, as described in a previous report [20]. Moreover, these vesicles were shown to include rhodopsin by ultrastructural immunohistochemistry (Fig. 3F), indicating that the particles were derived from photoreceptors. In SD-OCT images of 4-week-old RP rabbits, the area between the ELM and BM was hyper-reflective even though the reflectivity and the thickness of the ONL were unchanged (Fig. 2A). These observations point to the mechanism by which photoreceptors degenerate in RP rabbits. That is, defective transport of rhodopsin from the IS to the OS, which was demonstrated in mice with mutated rhodopsin P347S by using an antibody against the mutated rhodopsin [39], is followed by cleavage of vesicles from the IS, and finally cell bodies of photoreceptors degenerate. It is speculated that early stage RP patients may have mutations in the rhodopsin gene if hyper-reflective patterns are detected with SD-OCT in the area corresponding to the IS and OS, though further studies are needed to confirm this speculation.

